



**“VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA  
DE PARACETAMOL Y APLICACIÓN A  
UN ESTUDIO DE BIOEXENCIÓN”**

*E Costa*

**Supervisor de Práctica**

Prof. Q.F. Edda Costa C.  
Departamento de Ciencias y  
Tecnología Farmacéutica

**Monitor de Práctica**

Q.F. Karla Rodríguez R.  
Jefe de Control de Calidad  
Prod. Farmacéuticos Medipharm®

Unidad de Práctica Tutorial para optar al título de Químico Farmacéutico

FRANCISCO JAVIER GAETE CASTRO

Santiago

2014

# ÍNDICE

Índice.....	2
Resumen.....	3
Descripción del laboratorio.....	5
Introducción.....	6
Conceptos.....	9
Objetivos.....	11
Marco teórico.....	12
Materiales.....	18
Metodología.....	19
Parámetros para validar.....	24
Resultados y discusiones.....	29
Perfiles comparativos.....	41
Conclusiones.....	44
Bibliografía.....	45

## RESUMEN

Los estudios de bioequivalencia tienen por objetivo demostrar similitud de comportamiento farmacocinético entre un medicamento genérico o similar en comparación con el medicamento de referencia o innovador. La realización de estos estudios implica elevados costos y extensos plazos, lo que impacienta tanto a los laboratorios fabricantes, como a la autoridad sanitaria y a los mismos pacientes.

Aparece como respuesta a las dificultades anteriormente expuestas los estudios de bioexención *in vitro* para optar al estatus de bioequivalente, los que bajo condiciones experimentales controladas e inherentes al principio activo en estudio, permiten predecir y extrapolar de manera cercana a la realidad el comportamiento farmacocinético de este activo en el organismo.

Durante la estadía como estudiante en práctica en el laboratorio de control de calidad y centro biofarmacéutico de Productos Farmacéuticos Medipharm® se llevaron a cabo estudios preliminares para la bioexención de estudios de bioequivalencia *in vivo* para el producto Gesidol® comprimidos 500 mg cuyo principio activo es paracetamol. Recabando información sobre el principio activo, aparece la inquietud de cómo trabajar con un activo clasificado por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) como clase IV (poco soluble y poco permeable), pero que aparece clasificado como Clase I por el Instituto de Salud Pública (ISP) y como Clase II en otras bibliografías. Se acudió a la literatura para buscar criterios que demostraran que paracetamol es un activo apto para optar a bioexención de bioequivalencia *in vitro* y poder demostrar equivalencia terapéutica. Utilizando una variante del SCB, el *Sistema de Clasificación Biofarmacéutico basada en la Disposición del Fármaco* (SCBDF) se puede demostrar que paracetamol es un principio activo apto para realizar estos estudios. Esta información fue complementada con pruebas de disolución *in vitro* del producto frente a su referente, de acuerdo a lo establecido por la norma.

Los estudios realizados abarcaron junto con la etapa de recopilación bibliográfica, las etapas de validación de la metodología analítica y la obtención de las características de similitud a través de comparaciones de los perfiles de disolución del producto de prueba y del producto de referencia. Estos análisis se realizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a detector UV-DAD (detector UV con arreglo de diodos). La obtención de los perfiles de disolución y su posterior análisis estadístico fue realizado determinando el porcentaje de activo liberado en cada tiempo de muestreo y dichos datos fueron

cotejados para llevar a cabo la comparación de las curvas, y eventualmente realizar el cálculo del factor de similitud  $f_2$ , que en este caso no es necesario de realizar debido a la muy rápida liberación del activo (mayor al 85% de la cantidad declarada antes de 15 minutos), lo que demuestra que la liberación no constituye un obstáculo para la posterior absorción y que este tiempo depende en forma exclusiva del vaciamiento gástrico.

## DESCRIPCIÓN DEL LABORATORIO Y CENTRO BIOFARMACÉUTICO

Productos Farmacéuticos Medipharm<sup>®</sup> es un laboratorio de productos farmacéuticos perteneciente al consorcio de empresas Salcobrand<sup>®</sup>. Actualmente funciona como una droguería debido a que no posee planta productiva propia, pero ejerce las labores de almacenamiento y distribución de productos terminados en cuarentena y liberados por diferentes “maquiladores”. Actualmente posee tres departamentos, los cuales son:

**Departamento de Desarrollo:** encargado de formular, modificar y escalar la fabricación de productos farmacéuticos, tanto productos nuevos como los ya existentes en el mercado.

**Departamento de Control de Calidad y Centro de Bioequivalencia:** está encargado de realizar estudios de estabilidad ambiente y acelerado, control de calidad de rutina de los productos fabricados que se encuentran en cuarentena por los laboratorios maquiladores, como también los productos que ya se encuentran liberados para su distribución en farmacias. Actualmente el laboratorio de control de calidad de Medipharm<sup>®</sup> está autorizado por el ISP para realizar estudios *in vitro* para optar a bioexención <sup>[9]</sup>. Dentro de los análisis realizados en dicho laboratorio se puede mencionar:

- Medición de pH y valoraciones potenciométricas.
- Valoraciones volumétricas.
- Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)
- Análisis por espectrofotometría ultravioleta (UV).
- Análisis por espectrofotometría infrarroja (IR).
- Ensayos de cinética de disolución.
- Determinación de humedad por método de Karl Fischer.
- Ensayo de dureza de comprimidos.
- Ensayo de desintegración.
- Ensayo de friabilidad.
- Ensayo de viscosidad..
- Estudios de bioexención.
- Estudios de solubilidad de principios activos.

**Departamento de Validaciones:** es el encargado de diseñar, corregir y mejorar las metodologías analíticas de productos nuevos y ya comercializados, además de realizar las tareas de documentar todos los procesos y antecedentes para la autoridad sanitaria.

## INTRODUCCIÓN

Un tema que se ha tomado la agenda pública a través de la autoridad regulatoria, la industria farmacéutica, los medios de comunicación masivos y la opinión pública en general se refiere a la intercambiabilidad de los medicamentos. Actualmente están disponibles en el mercado chileno una gran cantidad de productos farmacéuticos; pero no así de principios activos. Esto hace que existan variadas formulaciones basadas en el mismo fármaco, las cuales poseen distintos orígenes, métodos de fabricación, polimorfos y comportamientos en el organismo. Queda claro que existen muchos equivalentes farmacéuticos pero que no necesariamente son bioequivalentes entre sí, por lo que surge entonces la inquietud por parte de los profesionales de la salud y de la autoridad regulatoria de cómo poder asegurar a los pacientes la eficacia e intercambiabilidad de los medicamentos. A través de un estándar común mínimo que es establecido por la autoridad regulatoria nace el concepto de bioequivalencia.

La bioequivalencia está definida por el ISP como *“Atributo de un medicamento respecto de un referente, en donde ambos poseen diferentes orígenes de fabricación, contienen igual principio activo y cantidad y son similares en cantidad y velocidad de fármaco absorbido, al ser administrados por la vía oral, dentro de límites razonables, establecidos por procedimientos estadísticos”* <sup>[1]</sup>. Es decir, es una forma de asegurar la equivalencia terapéutica entre dos productos farmacéuticos, que son similares en su principio activo, dosis y vía de administración, pero que difieren en otros aspectos como el marketing y su precio de venta.

Si bien, desde el punto de vista farmacocinético, la bioequivalencia se limita sólo a investigar los fenómenos de liberación y absorción, el promover la realización de estudios de bioequivalencia no sólo tiene importancia desde el punto de vista terapéutico sino que también influye positivamente en la accesibilidad a dichos medicamentos por parte de los pacientes, el estado y las aseguradoras de salud, aspecto especialmente relevante cuando algunos principios activos no se encuentran presentes en el Formulario Nacional de Medicamentos y es consecuente con la Política Nacional de Medicamentos de Chile, la cual señala que *“Los medicamentos comercializados en el país deben cumplir con requisitos de calidad en términos de eficacia, seguridad y de equivalencia terapéutica, cuando corresponda, para asegurar la intercambiabilidad, con el fin de que el estado pueda garantizar el acceso y disponibilidad a medicamentos eficaces y seguros a la población”* <sup>[2]</sup>.

Se entiende la bioequivalencia como un estándar de calidad para medicamentos de múltiples orígenes, impulsado principalmente desde los gobiernos de países desarrollados donde el costo derivado de medicamentos y de los sistemas de salud cada año se incrementa cada vez más, resultando una buena forma de acceder a medicamentos de forma más asequible y sin menoscabar la calidad de éstos <sup>[3, 4]</sup>.

Para considerar a un medicamento similar como *equivalente terapéutico* de otro, el cual es un innovador, deben establecerse varias cualidades como:

- **Equivalente Farmacéutico:** debe tener mismo principio activo, misma potencia, misma dosis y forma de administración, etiquetado y rotulado comparables.
- **Bioequivalencia:** contempla mediciones *in vivo* de fracciones del principio activo en fluidos biológicos, comparaciones farmacodinámicas *in vivo*, comparaciones clínicas *in vivo*, comparaciones *in vitro*.

Se establece que la equivalencia terapéutica de una formulación es la suma de su calidad de *equivalente farmacéutico* más la *bioequivalencia* <sup>[4]</sup>.

Juntos con las soluciones, también aparecen las dificultades y entre ellas, la más compleja de sortear surgió con las primeras exigencias de la autoridad regulatoria respecto de los estudios de bioequivalencia, fue que éstos resultaron ser muy costosos, debían ser realizados en centros especializados tales como hospitales, clínicas y centros médicos o de investigación, requerían de muchos voluntarios y que éstos fueran de un perfil biológico homogéneo, en cuanto a edad, sexo, estilo de vida, enfermedades existentes, etc., lo cual retrasó considerablemente los plazos de implementación y desalentó a la industria farmacéutica a realizar dichos estudios, especialmente en los países en vías de desarrollo como el nuestro.

Ello impulsó una alternativa de estudio que permite asegurar la intercambiabilidad de medicamentos a través de estudios *in vitro*, y que en general tienen buena correlación con lo que acontece en el organismo: los estudios de liberación-disolución *in vitro* para optar a bioexención de estudios de bioequivalencia *in vivo* con el fin de establecer equivalencia terapéutica.

El estudio de bioexención se puede definir como un estudio alternativo al estudio de bioequivalencia *in vivo* mediante la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro* para un cierto grupo de fármacos que cumplen los requisitos señalados por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) <sup>[3,5]</sup>. Dicho

estudio consiste básicamente en la comparación de los perfiles de disolución *in vitro* entre el producto farmacéutico innovador y el producto similar. Para realizar dichos estudios se deben cumplir condiciones básicas tales como:

- Los productos farmacéuticos deben ser fabricados bajo las Buenas Prácticas de Manufactura, en inglés *Good Manufacturing Practices* GMP, además de cumplir las especificaciones de calidad de las farmacopeas oficiales.
- Los principios activos deben tener suficientes antecedentes bibliográficos que demuestren su buena permeabilidad y solubilidad en distintos pH fisiológicos, datos que se encuentran disponibles en la literatura especializada a través del SCB, planteado por *Amidon et. al*, sistema avalado y respaldado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) <sup>[5,6]</sup>.

Actualmente, varios autores están desarrollando sistemas de clasificación alternativos al SCB, con la idea de incorporar otros aspectos que son relevantes para el comportamiento farmacocinético de una formulación farmacéutica. Un ejemplo de sistemas alternativos es el SCBDF planteada por *Benet et al.*, el cual se utilizará como referente en esta investigación <sup>[7,13]</sup>.

Las agencias regulatorias europea y estadounidense (EMA y FDA) han adoptado los criterios del SCB para establecer equivalencia terapéutica entre formulaciones de un mismo activo; para el caso especial de los fármacos Clase I del sistema SCB (altamente solubles y altamente permeables) no es necesaria la demostración comparativa de bioequivalencia *in vitro* siempre y cuando los excipientes usados y el proceso de manufactura no afecten la absorción del activo y que el principio activo no posea estrecho margen terapéutico. Actualmente también se extiende la posibilidad de realizar estudios de bioexención a fármacos de clase III del SCB (alta solubilidad y baja permeabilidad) <sup>[8]</sup>.

Es así que se resuelve de una manera sencilla, económica y rápida la necesidad de contar con estudios de bioequivalencia en los países en vías de desarrollo como Chile, promoviendo metodologías avaladas internacionalmente por investigadores expertos en la materia, realizables con instrumental disponible en la mayoría de los laboratorios nacionales, los cuales poseen facilidades de mantención y calificaciones periódicas y a un costo económico y de tiempo mucho más acotado. A pesar de todos los beneficios mencionados anteriormente, el mayor impacto se relaciona con la mejora en la accesibilidad de los pacientes a los medicamentos sin extender el plazo de los estudios.

## CONCEPTOS

### **Validación:**

Definido en su generalidad, consiste en el establecimiento de pruebas documentadas que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados. Estos estudios son aplicables a pruebas analíticas, procesos, sistemas y equipos. Los estudios de validación verifican un sistema en estudio y en condiciones de prueba extrema, semejantes a las condiciones a las que se esperan durante el proceso, a fin de verificar que el sistema se encuentra bajo control <sup>[18]</sup>. El ISP tiene su propia definición de validación: Proceso mediante el cual se demuestra la aplicabilidad de un método analítico y consiste en el establecimiento de una evidencia documentada que demuestre con alto grado de probabilidad que el método es confiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos <sup>[8]</sup>.

### **Bioequivalencia** <sup>[1]</sup>:

Atributo de un medicamento respecto de un referente o medicamento de referencia en donde ambos poseen diferentes orígenes de fabricación, contienen igual principio activo y cantidad y son similares en cantidad y velocidad de fármaco absorbido, al ser administrados por vía oral, dentro de límites razonables y establecido por procedimientos estadísticos. Dentro de los estudios englobados en los estudios de bioequivalencia se incluyen estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y clínicos, todos realizados *in vivo*, es decir, en personas y no en laboratorio. Su fin es documentar la equivalencia terapéutica usando como fuente los estudios farmacéuticos y clínicos los aportados por el producto farmacéutico innovador <sup>[1]</sup>.

### **Equivalentes farmacéuticos** <sup>[5]</sup>:

Son productos farmacéuticos que contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos, o sus mismas sales o ésteres, en idéntica forma farmacéutica y vía de administración, pero no necesariamente contienen los mismos excipientes, y que cumplen con las mismas o comparables especificaciones de calidad.

### **Equivalentes terapéuticos** <sup>[5]</sup>:

Se le denomina así a productos farmacéuticos equivalentes terapéuticos si son además equivalentes farmacéuticos y, después de la administración en la misma dosis molar, sus efectos, con respecto a eficacia y seguridad, son esencialmente los mismos, determinados por estudios apropiados (clínicos, farmacodinámicos, de bioequivalencia, o "*in vitro*"). Tales productos deben estar adecuadamente rotulados y ser manufacturados cumpliendo con las normas vigentes de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).

### **Bioexención** <sup>[5]</sup>:

Es la prerrogativa de la autoridad regulatoria para eximir de la obligación de tener que presentar estudios *in vivo* para el establecimiento de la equivalencia terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios *in vitro*. En resumen es un estudio científico acotado y alternativo a los estadios de bioequivalencia *in vivo* a través de la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro*. Está limitada a un determinado grupo de fármacos, los cuales deben cumplir como condición intrínseca ser muy solubles y muy permeables. Generalmente se basa en los datos proporcionados por el SCB.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Validar la metodología analítica para realizar el estudio de bioexención de Gesidol<sup>®</sup> comprimidos 500 mg.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

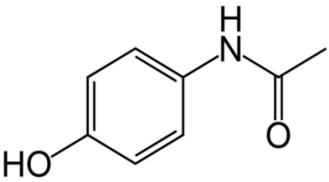
- Conocer y llevar a cabo los distintos análisis realizados en el laboratorio de control de calidad de Medipharm<sup>®</sup>, tanto los realizados en forma rutinaria, como los destinados a resolver situaciones concretas, usando de referencia las farmacopeas oficiales así como también las metodologías internas del laboratorio.
- Realizar una recopilación bibliográfica sobre paracetamol en la que se justifique debidamente la razón por la cual este principio activo es apto para optar a la bioexención de estudios de bioequivalencia *in vivo*.
- Llevar a cabo la validación de la metodología analítica para Gesidol<sup>®</sup> 500 mg involucrando los parámetros exigidos por la autoridad sanitaria tales como: linealidad, precisión, exactitud, rango, especificidad, estabilidad, robustez, influencia del sistema de filtración y precisión intermedia.
- Obtener los perfiles de liberación del medicamento innovador y de Gesidol<sup>®</sup> 500 mg y verificar si son comparables mediante el factor de similitud  $f_2$ .

## MARCO TEÓRICO

### ANTECEDENTES PREVIOS

En el caso del paracetamol se deben considerar sus propiedades físico-químicas para clasificarlo correctamente según el SCB u otros criterios para poder postular a tener equivalencia terapéutica mediante bioexención. Sus características se presentan a continuación <sup>[10,11]</sup> :

Nombre DCI	Paracetamol (Acetaminofeno)
Peso molecular	151,6 g/mol
Nombre químico	N-(4-hidroxifenil) acetamida
Fórmula molecular	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Número CAS	103-90-2
LD <sub>50</sub> (ratones)	338 mg/Kg



#### Química <sup>[11]</sup>:

El paracetamol está estructuralmente emparentado con la anilina y con el fenol, compartiendo características químicas de ambos. Desde el punto de vista ácido-base es un ácido muy débil con un pK<sub>a</sub> de 9,4. Forma cristales principalmente como prismas monoclinicos. Es escasamente soluble en agua fría pero mayormente soluble en agua caliente, soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, diclorometano, acetona y acetato de etilo, pero es prácticamente insoluble en éter de petróleo, pentano y benceno.

#### Solubilidad <sup>[12]</sup>:

Una parte de paracetamol es soluble en 70 partes de agua a 25°C y soluble 1 en 20 partes de agua a 100°C. La literatura reporta solubilidades de 14,7 mg/mL a 20°C y 23,7 mg/mL a 37°C. El paracetamol no se ioniza sustancialmente a pH menor a 8, por lo tanto, su solubilidad varía muy poco con los valores de pH fisiológicos.

#### Permeabilidad <sup>[12]</sup>:

Mediciones realizadas en tejido intestinal de rata mediante técnica de perfusión determinó para paracetamol un P<sub>H</sub> de 0,86 ± 0,5 x 10<sup>-4</sup> cm/s y se estima que la fracción absorbida asciende al 80%. Tradicionalmente, los datos de permeabilidad del paracetamol se han recolectado mediante técnicas con perfusiones de rata o utilizando la cámara de Ussing. Ambas técnicas y los datos recolectados sugieren que el paracetamol debe ser clasificado como compuesto de baja permeabilidad, debido a que la permeabilidad de la pared es menor que el valor límite que generalmente se considera de 2 - 4 x 10<sup>-4</sup> cm/s.

El porcentaje de la dosis absorbida se puede calcular sumando el porcentaje biotransformado a través del hígado mediante metabolismo de primer paso, a la biodisponibilidad absoluta. Esto sugiere que la fracción de dosis absorbida es mayor que 80% siendo que el valor límite de un principio activo para ser clasificado como *muy permeable* por los actuales criterios del SCB es una fracción de la dosis absorbida mayor al 90% (según la FDA). Estos datos llevan a la conclusión de que paracetamol sea clasificado como *poco permeable*.

El SCB obtiene los datos de solubilidad mediante determinaciones analíticas y los datos de permeabilidad son obtenidos a través de ensayos de difusión a través de membranas biológicas. La Tabla N°1 hace referencia clasificación de paracetamol a través del sistema SCB propuesto por *Amidon et. al.*:

Tabla N°1: Clasificación de Paracetamol bajo los criterios de la SCB <sup>[12]</sup>.

Molécula: Paracetamol (Acetaminofeno)				
Número CAS:	103-90-2			
Categoría:	Agentes que influyen en el sistema nervioso central			
Subcategoría:	Analgésicos (otros)			
Fórmula química:	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>			
Peso molecular:	151.16 g/mol			
pK <sub>a</sub> :	9.38			
Solubilidad mínima (mg/mL):	0.1			
Permeabilidad en humanos (x 10 <sup>-4</sup> cm/s):	N/A			
logP:	0.55		Baja permeabilidad	
Lista de países:	Dosis mínima (mg)	Dosis máxima (mg)	Solubilidad	Clase SCB (logP)
EEUU	300.0	750.0	Baja	Clase IV
OMS	100.0	500.0	Baja	Clase IV
Japón	200.0	300.0	Baja	Clase IV
Surcorea	80.0	500.0	Baja	Clase IV
Reino Unido	250.0	1000.0	Baja	Clase IV

Dentro de esta clasificación surge una de las primeras dificultades para llevar adelante el estudio. Según los datos de solubilidad y permeabilidad señalados en el SCB, paracetamol aparece catalogado como clase IV y según otros autores, es clasificado como clase III teniendo siempre como limitante entre ambas clases a la permeabilidad, por lo cual no es apto para ser sujeto de un estudio de bioexención. Si bien se tiene que reconocer que el SCB ha permitido ahorrar mucho tiempo y costos en poder establecer la necesidad o no de realizar estudios *in vivo*, también es cierto que omite importantes detalles que modifican la biodisponibilidad de un principio activo y que, necesariamente deben ser tomados en cuenta a la hora de realizar un estudio de bioexención. Entre las omisiones que se deberían tomar en cuenta por parte del SCB respecto de los fármacos a estudiar son:

- Tipo y cuantía de la metabolización.
- Efecto de los transportadores de membrana.
- Influencia de los alimentos.
- Principales rutas de eliminación.

Surge un sistema de clasificación complementario y claramente no excluyente del SCB como herramienta para resolver de buena manera estas variables no contempladas. Es el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica basada en la Disposición del Fármaco o droga, *SCBDF* (en inglés BDDCS) <sup>[7,13]</sup>. Este sistema fue propuesto por los profesores *Chu-Yuan Wu* y *Leslie Z. Benet* de la Universidad de California - San Francisco el año 2005 y hasta el momento ha gozado de gran aceptación dentro de la comunidad científica ya que correlaciona de mejor manera el comportamiento de un principio activo *in vitro/in vivo*.

### **Sistema de Clasificación Biofarmacéutica basada en la Disposición del Fármaco (SCBDF) <sup>[7]</sup>**

La diferencia fundamental entre el SCB y el SCBDF es el reemplazo de la variable “*permeabilidad*” utilizada por el SCB por la variable “*metabolización*” (expresado como porcentaje), postulando que la cuantía de la metabolización de un principio activo es directamente proporcional a la absorción que éste experimenta en el organismo<sup>[9]</sup>. *Wu* y *Benet* afirman que clasificar a los principios activos por su porcentaje de metabolización es menos susceptible de error que hacerlo considerando la permeabilidad, proponiendo al SCBDF como reemplazo de esta variable dentro de los estudios de bioexención <sup>[7,13]</sup>.

*Wu* y *Benet* sugirieron que un fármaco cuya principal vía de eliminación ocurre través de procesos metabólicos, en general exhibía una alta permeabilidad, y por el contrario, los fármacos con eliminación inalterada, ya sea renal o biliar, se clasificaron como de baja permeabilidad. Los autores definieron “*altamente metabolizado*” a los principios activos administrados por vía oral cuya tasa de recuperación de metabolitos es mayor al 70% y los “*escasamente metabolizados*” con una recuperación inferior al 50%. De esta manera surgen las nuevas clasificaciones basadas en el SCBDF <sup>[12,13]</sup>. En la Tabla N°2 se hace referencia a los criterios utilizados por el sistema SCBDF:

Tabla N°2: Clasificaciones utilizadas por el sistema SCBDF.

	Solubilidad Alta	Solubilidad Baja
Alta Metabolización	<b>Clase 1</b> Solubilidad Alta Metabolización Alta	<b>Clase 2</b> Solubilidad Baja Metabolización Alta
Baja Metabolización	<b>Clase 3</b> Solubilidad Alta Metabolización Baja	<b>Clase 4</b> Solubilidad Baja Metabolización Baja

- **Clase 1: Alta Solubilidad, Altamente Metabolizado:** El efecto de los transportadores no tienen importancia clínica en la biodisponibilidad).
- **Clase 2: Baja Solubilidad, Altamente Metabolizado:** (la variable limitante de la absorción es la baja solubilidad que limitará la concentración del principio activo al interior del enterocito y podría saturar a los transportadores de membrana).
- **Clase 3: Alta Solubilidad, Escasamente Metabolizado:** (la absorción depende mucho de los transportadores de membrana, no pueden difundir libremente).
- **Clase 4: Baja Solubilidad, Escasamente Metabolizado:** (los transportadores juegan un importantísimo rol en la biodisponibilidad de estos fármacos, constituyendo el paso limitante).

Es importante mencionar que los principios activos clasificadas bajo el SCBDF como clase I y II son altamente eliminados a través de metabolización (reacciones de oxidación y conjugación mayoritariamente). Es así como el SCBDF puede extender el número de fármacos admisibles de ser aceptados para realizar estudios de bioexención, usando como criterio diferencial su eliminación renal y biliar, lo que constituye un criterio más cercano a la realidad.

En el caso de paracetamol, químicamente es una molécula ácido débil y, generalmente estos principios activos son altamente solubles en una región alta de pH donde su grado de ionización es mayor y la permeabilidad no constituye una limitación adicional para ser absorbido en altos rangos de pH, como ocurre en el intestino delgado. Paracetamol experimenta una metabolización de entre 62 al 89% a través de conjugación con glucurónidos y sulfatos y se han obtenido recuperaciones de sus metabolitos de hasta un 95% en orina <sup>[12]</sup>. Estos antecedentes permiten concluir que paracetamol es un fármaco apto para cumplir los requisitos del sistema SCBDF y ser clasificado como Clase I (altamente metabolizado y alta solubilidad) <sup>[7,14]</sup>. En la Tabla N°3 se hace referencia a la reclasificación de algunos principios activos en consideración del metabolismo que experimentan en el organismo.

Tabla N°3: Extracto de datos de disposición de algunos activos pertenecientes a la lista de medicamentos esenciales de la OMS reclasificados al sistema SCBDF [7,15].

Nombre Principio Activo	Dosis (mg)	Solubilidad (mg/mL)	Biodisponibilidad (%)	Grado de metabolización	SCB	SCBDF
Ácido Acetilsalicílico	500	4,6	Sin datos	Alto	3	1
Clomifeno Citrato	50	1	90	Bajo	1	3
Levotiroxina Sódica	0,1	0,15	70	Bajo	1	3
Metildopa	250	10	25	Alto	3	1
Paracetamol <sup>[14]</sup>	<b>500</b>	<b>0,1</b>	<b>75</b>	<b>Alto</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
Praziquantel	600	0,4	80	Alto	2	2
Salbutamol	4	33	44	Bajo	3	3
Sulfasalazina	500	0,01	No aplica	Alto	2	2

Es notable la diferencia que existe entre la clasificación que tiene paracetamol bajo el SCB (clase IV) y bajo el SCBDF (Clase I) lo que se puede explicar por las siguientes consideraciones <sup>[14]</sup>:

- Bajo el SCBDF, el lumen intestinal es lo suficientemente poroso y permeable para permitir rápidamente el paso de moléculas de bajo peso molecular, no polares y solubles. Además, la alta permeabilidad y solubilidad de los compuestos clase I permiten saturar los transportadores de recaptación y las bombas de eflujo de los cuales son sustratos, aunque esto no tiene importancia clínica pues no constituyen elementos limitantes.
- Bajo el SCBDF se establece que los alimentos ricos en grasas no tienen un efecto significativo en los fármacos clase I porque la influencia de los transportadores en la biodisponibilidad es mínima para estas moléculas. Lo que sí alteran es el tiempo máximo debido a que los alimentos ricos en grasas tienden a retardar el vaciamiento gástrico y por ende, retardan el inicio de acción de algunos principios activos.
- Al ser metabolizados por el hígado y el lumen intestinal, la interacción ocurre solamente en los transportadores de membrana.

Es así que usando estos nuevos criterios, el SCBDF extiende el número de fármacos Clase I que pueden optar a estudios de bioexención, permitiendo en varios casos que algunos fármacos clasificados como clase III según el SCB y que no eran aptos para estudios de bioexención, fueran reclasificados como Clase I bajo el SCBDF <sup>[7,14]</sup>. En general, las conclusiones obtenidas de este enfoque, permiten deducir que los fármacos altamente permeables pero escasamente

metabolizados son sustancias polares de bajo peso molecular y son absorbidas mayoritariamente por mecanismos de transporte activo. A su vez se puede concluir que la biodisponibilidad es alta (mayor al 90%) o completa cuando el principio activo experimenta un gran metabolismo (mayor al 90%) [14].

En general, para obtener buenas correlaciones *in vivo* / *in vitro*, se deben tener en cuenta varios factores, entre ellos, la pérdida del principio activo por factores enzimáticos (metabolización en el tracto gastrointestinal por enzimas o flora intestinal), factores no enzimáticos (hidrólisis), etc. En la Tabla N°4 se hace referencia a las principales diferencias entre los sistemas SCB y SCBDF:

Tabla N°4: Diferencias entre los sistemas SCB y SCBDF [7].

	SCB	SCBDF
<b>Criterios de clasificación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilidad.</li> <li>• Permeabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilidad.</li> <li>• Metabolización.</li> </ul>
<b>Correlación</b>	Más compleja <i>in vivo/in vitro</i> .	Menos compleja <i>in vivo/in vitro</i> .
<b>Activos admisibles de Bioexención</b>	Número relativamente reducido.	Número mayor de activos respecto al SCB.
<b>Influencias externas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Influencia de alimentos.</li> <li>Influencia de transportadores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No tienen influencia los alimentos.</li> <li>No tienen influencia los transportadores.</li> </ul>

Es así que la sumatoria de los criterios utilizados oficialmente por las principales agencias regulatorias de medicamentos a nivel mundial (FDA y EMA) y el nuevo criterio de la SCBDF, se postuló ante la autoridad sanitaria que paracetamol es un fármaco apto para postular al estudio de bioexención, lo cual resultó ser aceptado mediante resolución exenta emitida por el Subdepartamento de Biofarmacia del ISP, la que fue recibida en el laboratorio de control de calidad [16].

## MATERIALES

### Equipos

- Equipo purificador de agua Merck<sup>®</sup> Millipore Milli-Q.
- Balanza analítica Mettler-Toledo<sup>®</sup> modelo XS205DU (IQ y OQ vigentes).
- Equipo de disolución Hanson<sup>®</sup> Research Vision Elite 8 con extractor de muestra automático Autoplus. (IQ y OQ vigentes) (verificación interna vigente).
- pH-metro, Mettler-Toledo<sup>®</sup> modelo SevenEasy con electrodo para bioequivalencia.
- Equipo HPLC Waters<sup>®</sup> Alliance con detector DAD (IQ y OQ vigentes).
- Equipo HPLC Merck<sup>®</sup> Lachrome Elite con detector DAD (IQ y OQ vigentes).

### Reactivos

- Estándar secundario paracetamol (N° de lote: 1202003 Pot.: 99,39% t.c.)
- Cloruro de potasio p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Ácido clorhídrico 37% p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Metanol grado HPLC (Merck<sup>®</sup>).
- Fosfato monobásico de potasio p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Hidróxido de sodio en lentejas p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Ácido acético glacial p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Acetato de sodio trihidrato p.a. (Merck<sup>®</sup>).
- Agua bidestilada Calidad Milli-Q.
- Solución de lavado Extran<sup>®</sup> al 2% (Merck<sup>®</sup>).

### Material de uso general

- Material de vidrio clase A de uso común en laboratorio.
- Papel filtro Millipore<sup>®</sup> 0,22µm de poro Hidrofílicos.
- Filtros membrana Millipore<sup>®</sup> Millex-GV (Durapore) PVDF; 0,22µm de poro, hidrofílica, amarilla.
- Porta filtro Sweenex<sup>®</sup> Millipore.
- Jeringas plásticas desechables de 10 mL.
- Tubos de ensayo y gradilla.
- Sonificador.

## METODOLOGÍA

La validación de la metodología analítica y la obtención de los perfiles de disolución de los productos farmacéuticos innovador y similar, se realizarán de acuerdo a lo estipulado en la guía técnica G-BIOF 2<sup>[8]</sup> redactada por el ISP, la cual establece los parámetros mínimos que se deben determinar en el proceso de validación. Esta guía recomienda y especifica variados aspectos como por ejemplo lo es la técnica de análisis; se puede utilizar espectrofotometría UV-visible por ser un método sencillo y con un mínimo gasto de solventes aunque, en este caso se prefirió utilizar cromatografía HPLC por ser una técnica que permite la automatización del proceso de lectura de numerosas muestras, permite detectar más fácilmente las eventuales interferencias de algunos excipientes y posibles productos de degradación, además de ser un método más sensible y con un menor límite de cuantificación.

### Producto en estudio:

- Principio activo: Paracetamol
- Forma farmacéutica: Comprimidos
- Nombre comercial: Gesidol<sup>®</sup> comprimidos 500 mg

### Producto de referencia o comparador:

- Principio activo: Paracetamol
- Forma Farmacéutica: Comprimidos
- Nombre comercial: Zolben<sup>®</sup> comprimidos 500 mg

## MÉTODO DE DISOLUCIÓN <sup>[5]</sup>

Es el ensayo *in vitro* que da cuenta de forma experimental el comportamiento de dos formulaciones en condiciones ambientales idénticas, de manera de poder establecer los perfiles cinéticos de disolución de un principio activo desde una forma farmacéutica sólida con la finalidad de compararlos mutuamente.

Los métodos de disolución más comúnmente empleados son los del canastillo (aparato 1) y de la paleta (aparato 2) de la USP. Estos métodos son suficientemente flexibles para permitir evaluar las características de disolución de una gran variedad de productos, por lo que se recomienda su uso, a menos que se demuestre que no son satisfactorios. Los aparatos para probar la disolución utilizados en esta evaluación deberán conformarse a los requisitos de la USP.

## CONDICIONES DEL ENSAYO DE DISOLUCIÓN

- Aparato II de la USP (paletas).
- Velocidad: 75 rpm.
- Número de unidades: 12 comprimidos (un lote).
- Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 20, 30 minutos.
- Temperatura:  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
- Volumen medio: 900 mL de los medios detallados posteriormente (soluciones amortiguadoras de pH 1,2; 4,5 y 6,8).

Los tiempos de muestreo, la frecuencia y el tiempo total del ensayo, tanto del producto de prueba como el de referencia deben permitir la obtención de un perfil adecuado de disolución para poder aplicar los criterios de similitud. Los tiempos de muestreo deben ser exactamente los mismos para ambos productos. En el caso de paracetamol, es una forma farmacéutica que presenta una rápida disolución en la formulación que se pretende estudiar, lo cual fue evaluado previamente a través de una prueba de disolución sobre 3 comprimidos. Se decide tomar muestras a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, considerando este último tiempo como punto sobre el cual se encuentra al menos 85% disuelto. Si bien es cierto que paracetamol está clasificado en Clase IV en el SCB, la información anterior permite establecer que la solubilidad en los pH de prueba no sería una limitante en la solubilidad/disolución del fármaco.

Para establecer similitud o diferencia entre las curvas del medicamento innovador y del medicamento ensayado, el cálculo de factor de similitud se realizará a cada uno de los tiempos indicados en el punto anterior, incluyendo el tiempo por sobre el 85% disuelto. Si se obtiene un porcentaje mayor al 85% disuelto a los 15 minutos o menos, en los 3 medios evaluados, se considera a las formulaciones como *formas farmacéuticas de liberación muy rápida* y, por lo tanto no será necesaria la comparación de perfiles con un cálculo de  $f_2$ . Esto se debe a que la Norma Chilena referida a equivalencia terapéutica establece que cumpliéndose esta condición, no es necesaria la comparación de los perfiles, aunque esto no exime la presentación de los perfiles de disolución de los productos en estudio y del producto de referencia<sup>[3,5]</sup>.

### **Soluciones amortiguadoras**<sup>[17]</sup>:

En el caso de los tampones, se prepararan idénticamente a lo establecido en la USP 36, capítulo <711> “soluciones”, tomando 900 mL de cada solución amortiguadora previamente desaireada y calentado a  $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  los cuales son los siguientes:

- **Solución amortiguadora de pH 1,2:** mezclar 50 mL de solución de KCl 0,2M y 85 mL de HCl 0,2 M y aforar a 200 mL con agua purificada. La solución resultante debe tener pH 1,2.
- **Solución amortiguadora de pH 4,5:** tampón acetato. Transferir 2,99 g de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) a un matraz aforado de 1000 mL. Agregar 14,0 mL de ácido acético 2N y llevar a volumen con agua purificada. Homogeneizar. El pH final debe ser de 4,5.
- **Solución amortiguadora de pH 6,8:** tampón fosfato. Transferir 50 mL de solución de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2M a un matraz aforado de 200 mL. Agregar 22,4 mL de NaOH 0,2M y llevar a volumen con agua purificada. Homogeneizar. La solución resultante tiene pH 6,8

Los aparatos y procedimientos generales para demostrar la cinética de disolución del principio activo desde su forma farmacéutica, así como también la forma como deben validarse los procedimientos utilizados en esta evaluación, deberán estar de acuerdo con los requisitos establecidos en farmacopeas oficiales como la USP <sup>[5]</sup>.

#### **Prueba de aptitud del sistema <sup>[8]</sup>:**

- **Calibración mecánica:** antes de realizar las mediciones, se verificarán los siguientes parámetros críticos del procedimiento de disolución: horizontalidad, centrado y vaivén de los ejes, fluctuaciones de temperatura, velocidad de rotación de los ejes y altura de las paletas.
- **Calibración química:** se empleará el calibrador estándar de la USP, comprimidos de prednisona 10 mg y se verificarán las especificaciones señaladas para los aparatos de disolución 1 ó 2, según corresponda al lote vigente.

#### **Desaireación del medio de disolución <sup>[8,17]</sup>:**

Se utilizará un método de desaireado basado en la USP 30, capítulo <711>, como sigue: *“Calentar el medio a 41°C, agitando en forma suave. Inmediatamente, filtrar al vacío, agitando vigorosamente, utilizando un filtro de porosidad 0,45 µm o menor, y continuar agitando bajo vacío durante 5 minutos”*. Se debe dejar el correspondiente registro de la operación.

## METODOLOGÍA ANALÍTICA

La cuantificación de paracetamol se debe realizar mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cuantificación del porcentaje del principio activo disuelto en los estudios de bioexención se realizarán utilizando una metodología HPLC validada para detectar posibles productos de degradación, basada en el método USP 36 para “paracetamol comprimidos” [17].

### Condiciones cromatográficas:

- Columna: C<sub>18</sub>, (L1), 30 cm x 3,9 mm, 5 μm (Novapak C<sub>18</sub>, 30 cm Waters)
- Temperatura: 30°C
- Fase móvil: [metanol: agua] = [25:75]. Filtrar y desgasificar.
- Velocidad de flujo: 0,5mL/min
- Detector: UV con  $\lambda=243$  nm
- Volumen de la inyección: 20μL.

### Estándar utilizado:

Se debe utilizar un estándar secundario de paracetamol, generado a partir de una materia prima vigente y el estándar primario de paracetamol USP. La metodología de análisis corresponderá al método de valoración por HPLC, de la USP 36 para paracetamol materia prima [17].

### Concentración de trabajo del estándar:

La concentración de la unidad posológica de interés en el volumen de medio fijado es de 0,011 mg paracetamol/mL, siendo 500 mg la dosis posológica por comprimido, 900 mL el volumen de medio utilizado y 5000 el factor de dilución de la muestra.

### Preparación solución muestra

Una vez cumplidos los tiempos fijados previamente, se toma una alícuota de 10 mL de la zona media entre la parte superior de la superficie de la paleta y la superficie del medio de disolución y de la zona media entre la pared del vaso y el vástago. Una vez obtenida la muestra, se diluyen 2 mL a 100 mL con fase móvil y se filtran por membrana adecuada.

## Procedimiento

Se inyecta en triplicado la solución estándar y se registra el área bajo la curva del “*peak*” principal correspondiente a paracetamol. Se determina el área bajo la curva promedio y el coeficiente de variación de dichos *peaks*, el cual no debe exceder el 2%. Posteriormente, se inyecta cada una de las soluciones muestra y se registra el área bajo la curva del “*peak*” principal del cromatograma. La inyección por triplicado se realiza solo con los estándares.

## Cálculos:

Para los cálculos se considera el área de los “*peaks*” de igual tiempo de retención obtenidos con solución estándar y muestra. Se determina la cantidad disuelta de paracetamol en cada medio y a cada tiempo según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ disuelto Paracetamol/comprimido} = \left( \frac{A_m \cdot P_{st} \cdot \left( \frac{\% \text{ pureza}_{t.c.}}{100} \right) \cdot 900 \cdot Fd_{mx}}{A_{st} \cdot Fd_{st} \cdot 500} \right) \cdot 100$$

donde:

- $A_M$ : Área del *peak* de paracetamol en la solución muestra.
- $A_{st}$ : Área media del *peak* de paracetamol en la solución estándar.
- $P_{st}$ : Pesada de estándar de paracetamol (mg)
- % Pureza: % de pureza de estándar de paracetamol expresada tal cual
- $Fd_{st}$ : Dilución de la solución estándar = 5000
- 900: Volumen de medio (mL)
- $Fd_{mx}$ : Dilución de la solución muestra = 50
- 500: Cantidad teórica de paracetamol por comprimido
- 100: Expresión de porcentaje.

## PARÁMETROS A VALIDAR <sup>[8]</sup>

### Linealidad:

Capacidad de un método analítico de asegurar que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, de manera que las mediciones obtenidas sean interpolables en un intervalo de concentraciones previamente fijado. Se determina directamente desde el analito mediante diluciones sucesivas de una solución estándar a través del cálculo de la regresión lineal y de la significancia de dicha regresión mediante uso de tabla *T-student* para  $n-2$  grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% según la fórmula:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|r| \cdot \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

donde:

$n$  = número de muestras

$r$  = regresión lineal obtenida

### **Criterios de aceptación:**

- Del gráfico de concentración v/s áreas se debe observar visualmente que la relación entre el área y la concentración es lineal y sin curvaturas.
- El coeficiente de correlación ( $r$ ) no debe ser menor de 0,999.
- El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) no debe ser menor que 0,98.
- El análisis estadístico para el coeficiente de regresión lineal debe mostrar linealidad: Al aplicar el *test de student* a las respuestas, el  $t_{\text{exp}}$  debe ser mayor al  $t_{\text{tabla}}$ , para  $n-2$  grados de libertad y un  $p=0,05$  (dos colas).
- El intercepto debe ser significativamente igual o cercano a 0. Esto puede ser demostrado por alguna de las siguientes formas:
- El coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $f$ ) debe ser  $< 5\%$ .
- El resultado de la relación  $\left( \frac{y_{x=0}}{\text{resp}_{100\%}} \right) \cdot 100$  debe ser  $\leq 3,0\%$ .

### Rango:

Intervalo de concentraciones, comprendida entre la mínima y la máxima concentración de analito en la muestra en el que se ha demostrado previamente que el método posee un buen nivel de precisión, exactitud y linealidad. El rango se deduce directamente del estudio de la linealidad del método.

### **Precisión:**

Grado de concordancia o dispersión de los datos obtenidos entre una serie de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea. Está influenciada por errores aleatorios, individuales e instrumentales. Se expresa en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. En este caso se obtiene por análisis de 6 determinaciones de la muestra al 100%.

### **Criterio de aceptación:**

- La desviación estándar relativa no deberá ser mayor al 2%.

### **Exactitud:**

Grado de cercanía entre el valor experimental obtenido durante un ensayo en comparación con el valor considerado como verdadero. Aritméticamente corresponde al promedio obtenido de varios resultados. Se obtiene como porcentaje de recuperación entre la media aritmética de las determinaciones y el valor considerado como el verdadero. Este valor puede verse influenciado por errores sistemáticos instrumentales, metodológicos o aleatorios. Se determina en tres concentraciones de trabajo obteniendo el promedio y la desviación estándar de las inyecciones.

### **Criterios de aceptación:**

- La exactitud (recuperación) para el promedio en cada concentración debe estar entre un 95 a 105%.
- El coeficiente de variación entre inyecciones no debe ser mayor al 2%.

### **Especificidad:**

Capacidad de un método analítico de poder cuantificar un analito de interés en presencia de otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra y que podrían actuar como interferentes. En este caso, dichas sustancias son los excipientes de la formulación de paracetamol 500 mg. Se realiza mediante la comparación de un estándar con una muestra placebo. La especificidad se calcula como porcentaje de interferencia, en que:

$$\% \text{ int} = C \cdot \left( \frac{A_p}{A_s} \cdot \frac{V}{L} \right) \cdot 100$$

- C = Concentración (mg/mL)
- $A_p$  y  $A_s$  = Área del placebo y del estándar
- V = Volumen (mL)
- L = dosis muestra (mg)

**Criterio de aceptación:**

- La interferencia no debe exceder el 2%.

**Robustez:**

Capacidad de un método analítico de entregar resultados con buen grado de precisión y exactitud siendo sometido a pequeños cambios deliberados en el método de análisis. Los cambios consisten en modificar la longitud de la columna cromatográfica y cambiar la temperatura de trabajo del equipo HPLC. De esta manera, se busca determinar que pequeños cambios en la metodología de análisis no alteren el resultado esperado.

**Criterio de aceptación:**

- La diferencia entre los valores promedio respecto de los valores de referencia no debe exceder el 5%.

**Estabilidad:**

Capacidad del principio activo presente en la muestra de permanecer sin cambios químicos ni físicos que alteren el análisis mientras éste se mantenga en solución. Se estudia la estabilidad, tanto de la solución estándar como de las muestras para determinar si existe una diferencia sustantiva en la lectura de las muestras entre sí, tanto para muestras a temperatura ambiente por 6 horas, como para muestras refrigeradas por 24 horas.

**Criterio de aceptación:**

- El porcentaje de recuperación debe estar entre el 98 y 102%.

### **Influencia del filtro:**

Este análisis se realiza para verificar si existe retención del analito de interés en los procesos de filtrado, tanto de la solución estándar como de la muestra. Se realiza con la muestra al 100% ya disuelta y la medición es la comparación entre las muestras antes y después de ser filtradas. El filtro debe dejar pasar al menos 10 mL de muestra para que ésta sea analizada.

### **Criterio de aceptación:**

- El porcentaje de recuperación debe estar entre el 98 y 102%.

### **Precisión Intermedia:**

Consiste en la comparación de resultados obtenidos para un perfil de disolución de 12 unidades de comprimidos de paracetamol 500 mg de un lote realizados con la misma fase móvil, misma columna y misma muestra, pero con diferentes equipos cromatográficos y analistas, de manera de poder apreciar si estos cambios tienen un efecto real en los resultados finales.

### **Criterio de aceptación:**

- La diferencia en los valores promedio, no debe exceder un 10% en aquellos tiempos en los que se ha disuelto  $\leq 85\%$  y un 5% en los que se ha disuelto más del 85% del fármaco en estudio.

### **Prueba de aptitud del sistema cromatográfico:**

Se realiza la verificación de los parámetros que garantizan un buen desempeño del sistema de análisis y equipo HPLC cada vez que se quiere ensayar cada uno de los parámetros anteriormente mencionados. Para ello, se determinan los siguientes parámetros con su criterio de aceptación propio:

- Asimetría o factor de cola de la señal (*tailing*)  $\leq 2$ .
- Número de platos teóricos de la columna (eficiencia de separación)  $\geq 900$ .
- Coeficiente de variación de inyecciones repetidas de un estándar  $\leq 2\%$ .

Este análisis se realiza antes de todas las pruebas mencionadas anteriormente y da una estimación de cómo está trabajando el equipo cromatográfico.

### **Factor de similitud $f_2$ <sup>[8]</sup>.**

Medida matemática simplificada utilizada para determinar la similitud de dos curvas correspondientes a perfiles de disolución. La comparación se realiza entre el perfil de disolución del medicamento innovador *versus* el perfil de disolución del medicamento similar. Los perfiles se clasifican como similares cuando  $f_2 \geq 50$ , pudiendo catalogar a un medicamento como equivalente terapéutico con respecto al innovador.

Los requisitos mínimos para que el cálculo de  $f_2$  sea válido son los siguientes:

- Mínimo de tres puntos temporales distintos del cero.
- Coeficiente de variación  $\leq 20\%$  en los puntos temporales tempranos.
- Coeficiente de variación  $\leq 10\%$  en el resto de los puntos temporales.

Estos criterios de aceptación se han definido de esta manera porque en general, se considera que dos formulaciones jamás tendrán la misma área bajo la curva ni  $C_{m\acute{a}x}$  y por convención se considera que diferencias iguales o inferiores al 20% no tienen significancia clínica relevante.

La ecuación está dada de la siguiente forma:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2\right)}} \right] \cdot 100 \right\}$$

Siendo  $R$  y  $T$ : valores promedio % acumulado de activo (12 unidades) al tiempo  $t$  del producto de referencia (R) y test (T).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Linealidad:

Se realiza mediante la preparación de una solución madre del activo (0,55 mg de paracetamol/mL), a partir de la cual se prepararon 5 soluciones en cada uno de los medios establecidos anteriormente, en el rango de 10 a 125% disuelto.

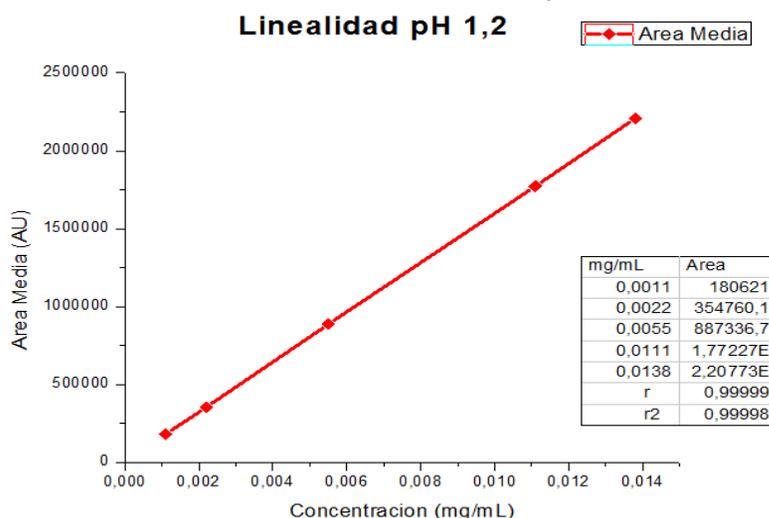
Cada una de las soluciones se inyecta en triplicado y se registran las respuestas correspondientes. Posteriormente se grafican los resultados de las respuestas (áreas promedio) *versus* su concentración. Se calculan los parámetros de la curva, tales como el intercepto, la pendiente, el coeficiente de correlación ( $r$ ) además, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Con los datos obtenidos anteriormente, se realizó un análisis estadístico para establecer la significancia de la regresión lineal (*t-student*), calculando un valor de  $t$  experimental ( $t_{exp}$ ) con  $n-2$  grados de libertad y 95% de confianza. Se verifica la linealidad mediante el test de linealidad, calculando el coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $f$ ).

Tabla N°5: resultados de linealidad en tampón pH 1,2

% Disuelto esperado	Concentración [mg/mL]	Área promedio	y/x (factor de respuesta)	Parámetros	Resultados
				$r$	0,99999
				$r^2$	0,99999
10	0,0011	180621	$1,64 \times 10^8$	Pendiente	$1,59 \times 10^8$
20	0,0022	354760	$1,61 \times 10^8$	Intercepto	5758,5
50	0,0055	887337	$1,60 \times 10^8$	T tabla	2,16
100	0,0111	1772271	$1,60 \times 10^8$	T exp.	1027,2
125	0,0138	2207727	$1,60 \times 10^8$	CV Fac. Res.	1,09%

Gráfico N°1: Análisis visual de linealidad en *buffer* pH 1,2

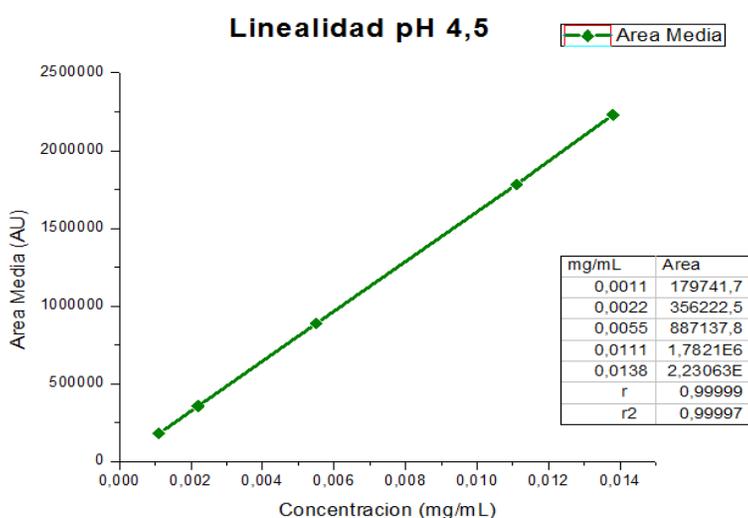


- Se observa linealidad de la relación obtenida entre concentración y área.
- $r$  y  $r^2$  son mayores a 0,999.
- $T$ -student a respuestas con  $n-2$  grados de libertad y  $p=0,05$  son  $t_{exp} > t_{tabla}$ .
- El intercepto es significativamente cercano a cero (CV Fac. resp.  $\leq 5\%$ ).

Tabla N°6: Resultados de linealidad en tampón pH 4,5

% Disuelto esperado	Concentración [mg/mL]	Área promedio	y/x (factor de respuesta)	Parámetros	Resultados
				r	0,99999
				r <sup>2</sup>	0,99997
10	0,0011	179742	$1,63 \times 10^8$	Pendiente	$1,61 \times 10^8$
20	0,0022	356223	$1,61 \times 10^8$	Intercepto	1234,6
50	0,0055	887138	$1,60 \times 10^8$	T tabla	2,16
100	0,0111	1782101	$1,61 \times 10^8$	T exp.	662,2
125	0,0138	2230632	$1,62 \times 10^8$	CV Fac. Res.	0,68%

Gráfico N°2: Análisis visual de linealidad en *buffer* pH 4,5

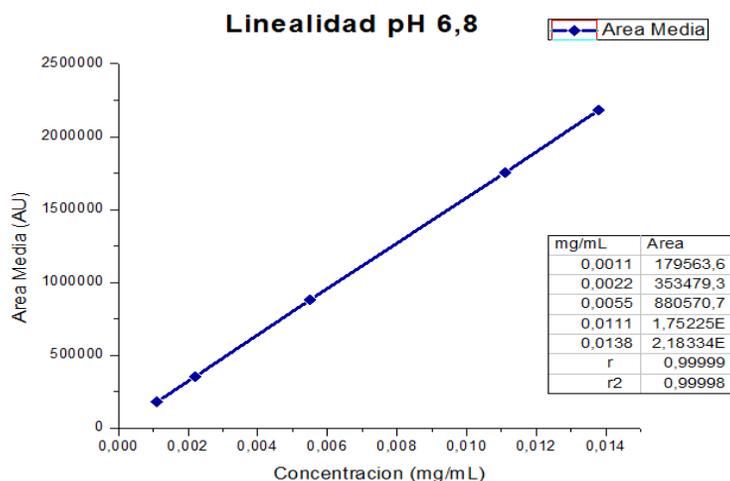


- Se observa linealidad de la relación obtenida entre concentración y área.
- $r$  y  $r^2$  son mayores a 0,999.
- $T$ -student a respuestas con  $n-2$  grados de libertad y  $p=0,05$  son  $t_{exp} > t_{tabla}$ .
- El intercepto es significativamente cercano a cero (CV Fac. resp.  $\leq 5\%$ ).

Tabla N°7: Resultados de linealidad en tampón pH 6,8

% Disuelto esperado	Concentración [mg/mL]	Área promedio	y/x (factor de respuesta)	Parámetros	Resultados
				r	0,99999
				r <sup>2</sup>	0,99998
10	0,0011	179564	$1,63 \times 10^8$	Pendiente	$1,58 \times 10^8$
20	0,0022	353479	$1,60 \times 10^8$	Intercepto	8188,5
50	0,0055	880571	$1,59 \times 10^8$	T tabla	2,16
100	0,0111	1752246	$1,59 \times 10^8$	T exp.	794,1
125	0,0138	2183343	$1,58 \times 10^8$	CV Fac. Res.	1,27%

Gráfico N°3: Análisis visual de linealidad en *buffer* pH 6,8



- Se observa linealidad de la relación obtenida entre concentración y área.
- $r$  y  $r^2$  son mayores a 0,999.
- $T$ -Student a respuestas con  $n-2$  grados de libertad y  $p=0,05$  son  $t_{exp} > t_{tabla}$
- El intercepto es significativamente cercano a cero (CV factor de respuesta  $\leq 5\%$ ).

Por lo tanto se puede demostrar que el método es lineal en todo el rango de concentraciones y medios de disolución estudiados.

## 2) Precisión:

Se obtiene a partir de la preparación de una solución estándar al 100% (0,011 mg/mL) en cada uno de los medios estudiados. Se inyecta seis veces y se mide el grado de dispersión de las áreas obtenidas. En la Tabla N°8 se visualizan los resultados de los ensayos de precisión.

Tabla N° 8: Resultados de precisión al 100% de la muestra en los tres pH de trabajo.

pH 1,2		pH 4,5		pH 6,8	
Inyecciones 6	Área	Inyecciones 6	Área	Inyecciones 6	Área
Área media	1774097,9	Área media	1783739,6	Área media	1751804,2
DS	3990,5	DS	1814,6	DS	2320,8
CV	0,22%	CV	0,10%	CV	0,13%

- Se observa que la desviación estándar relativa de los 6 valores obtenidos en cada medio de disolución es menor al 2%.

Por lo tanto se puede deducir que el método es preciso en el rango de concentración y medios de disolución evaluados.

### 3) Exactitud:

Se determina la exactitud del método preparando placebos cargados al 60%, 80% y 100% del principio activo (correspondientes a 300, 400 y 500 mg de paracetamol) y se busca el porcentaje de recuperación del activo adicionado al placebo a un estándar de concentración conocida. Estos placebos se someten al test de disolución bajo las condiciones dadas anteriormente (Aparato 2, 75 rpm, 900 mL de cada medio,  $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). En la Tabla N°9 se recopilan los porcentajes de recuperación en cada concentración, como promedio y desviación estándar de las inyecciones:

Tabla N°9: Resultados de exactitud al 60, 80 y 100% de la muestra en los tres pH de trabajo.

Muestra	pH 1,2			pH 4,5			pH 6,8		
	Recup. prom rango (%)	Recup. prom. (%)	CV (%)	Recup. prom rango (%)	Recup. prom. (%)	CV (%)	Recup. prom rango (%)	Recup. prom. (%)	CV (%)
Placebo 60%	60,6	101,3	0,6	60,3	100,1	0,8	60,4	101,4	0,6
Placebo 80%	81,2	101,8	0,07	80,8	101,5	0,2	80,3	100,9	0,7
Placebo 100%	100,1	100,1	0,9	101,3	101,3	0,4	100,2	100,2	0,5

- La recuperación del activo en cada concentración se encuentra entre un 95,0 a 105,0%.
- El coeficiente de variación entre las inyecciones es menor al 2%.

Por lo tanto se puede concluir que el método es exacto en el rango de concentraciones y medios de disolución evaluados.

### 4) Rango:

Corresponde al intervalo comprendido entre la concentración inferior y superior del analito donde se ha demostrado previamente que el método presenta aceptables niveles de linealidad, exactitud y precisión. El rango se deduce de los estudios anteriormente mencionados.

Por lo tanto se infiere a partir de los parámetros anteriormente evaluados que el de entre  $1,10 \times 10^{-3}$  y  $1,38 \times 10^{-2}$  mg de paracetamol / mL.

## 5) Especificidad:

Se determina la especificidad del método usando placebos al 0% (sin activo), y al 60%, 80% y 100% del activo cargado (300, 400 y 500 mg de paracetamol). Se determina que al inyectar solamente placebo, no se tiene ninguna señal detectable al tiempo de retención del analito en los tres medios estudiados. En la Tabla N°10 se adjuntan los resultados de especificidad de los placebos y los placebos cargados.

Tabla N°10: Resultados de especificidad al 60, 80 y 100% de la muestra en los tres pH de trabajo.

	Muestra	Encontrado (%)	Interferencia (%)	CV (%)	Límites
<b>pH 1,2</b>	Placebo 0%	No se observan <i>peaks</i>	-	-	Interferencia $\leq$ 2%
	Placebo 60%	59,1%	<b>1,96</b>	<b>0,29</b>	58,0-62,0%
	Placebo 80%	78,9%	<b>1,98</b>	<b>0,29</b>	78,0-82,0%
	Placebo100%	98,6%	<b>1,98</b>	<b>0,3</b>	98,0-102,0
<b>pH 4,5</b>	Placebo 0%	No se observan <i>peaks</i>	-	-	Interferencia $\leq$ 2%
	Placebo 60%	59,1%	<b>1,96</b>	<b>0,78</b>	58,0-62,0%
	Placebo 80%	79,2%	<b>1,98</b>	<b>0,51</b>	78,0-82,0%
	Placebo100%	98,9%	<b>1,98</b>	<b>1,2</b>	98,0-102,0
<b>pH 6,8</b>	Placebo 0%	No se observan <i>peaks</i>	-	-	Interferencia $\leq$ 2%
	Placebo 60%	59,4%	<b>1,99</b>	<b>0,29</b>	58,0-62,0%
	Placebo 80%	79,5%	<b>1,99</b>	<b>0,58</b>	78,0-82,0%
	Placebo100%	99,7%	<b>1,99</b>	<b>0,29</b>	98,0-102,0

- No se observan señales interferentes de los excipientes del placebo al tiempo de retención de paracetamol.
- El porcentaje de interferencia de los excipientes en los placebos cargados con paracetamol es cercano al 2% en todas las muestras.

Por lo tanto se observa que los excipientes de la formulación no interfieren significativamente con la señal cromatográfica de paracetamol en los medios de disolución evaluados.

## 6) Estabilidad:

Se evalúa la estabilidad de dos soluciones de interés: solución estándar y solución muestra, cada una de ellas estudiadas en los tres medios de disolución de interés. Se comparan las áreas de las muestras recién preparadas *versus* las áreas de las mismas muestras transcurridas 6 horas a temperatura ambiente y transcurridas 24 horas para las muestras refrigeradas. En las Tablas N°11, 12, 13 y 14 se presentan los resultados.

**Solución estándar:** muestras preparadas por diluciones.

Tabla N°11: Resultados de estabilidad al 100%. Solución estándar a temperatura ambiente por 6 horas en los tres pH de trabajo.

Medio	Muestra	%Recup.	Promedio %
pH 1,2	1	100,8	100,3 (CV 0,4%)
	2	100,0	
	3	100,1	
pH 4,5	1	100,9	101 (CV 0,1%)
	2	101,0	
	3	100,8	
pH 6,8	1	101,0	101 (CV 0,1%)
	2	101,2	
	3	101,0	

Tabla N°12: Resultados de estabilidad al 100%. Solución estándar a temperatura de refrigeración por 24 horas en los tres pH de trabajo.

Medio	Muestra	%Recup.	Promedio %
pH 1,2	1	101,4	101,9 (CV 0,7 %)
	2	102,7	
	3	101,8	
pH 4,5	1	101,8	101,9 (CV 0,1 %)
	2	102	
	3	102	
pH 6,8	1	101,5	101,6 (CV 0,1%)
	2	101,6	
	3	101,6	

- Se observa que los porcentajes de recuperación de paracetamol está entre el 98,0 al 102,0% tanto para las muestras a temperatura ambiente como para las muestras refrigeradas.
- Se observa que la recuperación para la solución estándar excede el 100% en todas las muestras.

**Solución muestra:** obtenida a partir del test de disolución

Tabla N°13: Resultados de estabilidad al 100%. Solución muestra a temperatura ambiente por 6 horas en los tres pH de trabajo.

Medio	Muestra	%Recup.	Promedio %
pH 1,2	1	99,6	99,7 (CV 0,1%)
	2	99,7	
	3	99,7	
pH 4,5	1	99,3	99,5 (CV 0,2%)
	2	99,6	
	3	99,6	
pH 6,8	1	100,2	100 (CV 0,3%)
	2	99,7	
	3	100,1	

Tabla N°14: Resultados de estabilidad al 100%. Solución muestra a temperatura de refrigeración por 24 horas en los tres pH de trabajo.

Medio	Muestra	%Recup.	Promedio %
pH 1,2	1	98,9	98,8 (CV 0,1%)
	2	98,8	
	3	98,8	
pH 4,5	1	99,6	99,7 (CV 0,2%)
	2	99,5	
	3	99,9	
pH 6,8	1	100,5	100,1 (CV 0,3 %)
	2	99,9	
	3	99,9	

- Se observa que los porcentajes de recuperación de paracetamol está entre el 98,0 al 102,0% tanto para las muestras a temperatura ambiente como para las muestras refrigeradas.
- Se observa que la recuperación para la solución muestra excede el 100% en muy pocas muestras.
- Se observan diferencias entre los porcentajes de recuperación de las soluciones estándares y las soluciones muestra. Esto se debe a la influencia de los excipientes presentes en la soluciones preparadas a partir de comprimidos de Gesidol®.
- En el caso de las soluciones estándar para ambos tiempos de estudio, se observa un leve aumento de las áreas registradas. Este fenómeno se debe a la presencia de metanol como solvente, el que cuando se encuentra a bajas temperaturas, disminuye su volumen, arrojando mayor concentración de activo por inyección. Para corregir este inconveniente, se sacaron las soluciones contenidas en viales desde el refrigerador 3 horas antes de la inyección, de manera que la fase móvil de dichos viales alcanzaran temperatura ambiente y se dilatara,

logrando igualar las condiciones de las muestras refrigeradas a las muestras tomadas a las cero y seis horas de preparación.

Por lo tanto, se puede inferir que la solución estándar y la solución muestra son estables antes de su análisis, almacenadas durante 6 horas a temperatura ambiente y durante 24 horas en refrigeración.

## 7) Robustez:

Corresponde a una medida de la capacidad de un método analítico de entregar resultados con exactitud y precisión aceptables, frente a cambios pequeños, pero deliberados, en los parámetros del método. De acuerdo al protocolo de validación, se realizan dos pruebas de robustez sobre una solución estándar al 100% en el sistema:

### 1. Cambios en la Columna de Análisis (Longitud).

- Columna Original: Nova-pak C<sub>18</sub> x 300mm x 3,9mm x 5µm.
- Columna Utilizada: Nova-pak C<sub>18</sub> x 150mm x 3,9mm x 5µm.

Tabla N°15: Resultados de robustez al 100%. Solución analizada en columna de 150 mm en los tres pH de trabajo.

Medio	Nº Inyección	% recuperación	% variación
pH 1,2	1	100,2	0,2
	2	100,4	0,4
	3	100,2	0,2
	Promedio	<b>100,3</b>	<b>0,3</b>
pH 4,5	1	101,3	1,3
	2	102	2
	3	101,5	1,5
	Promedio	<b>101,6</b>	<b>1,6</b>
pH 6,8	1	100,1	0,1
	2	99,4	0,6
	3	99,9	0,1
	Promedio	<b>99,8</b>	<b>0,2</b>

- Se observa que la diferencia entre los valores promedio en cada medio respecto al valor de referencia no excede un 3%.

## 1.2 Cambios en la Temperatura de la Columna (se cambia la temperatura de trabajo en 30°C ± 5°C)

Tabla N°16: Resultados de robustez al 100%. Solución analizada a **25°C** en los tres pH de trabajo.

Medio	Nº Inyección	% Recuperación	% variación
<b>pH 1,2</b>	1	-	-
	2	99,8	0,2
	3	100,1	0,1
	Promedio	<b>100</b>	<b>0,1</b>
<b>pH 4,5</b>	1	99,6	0,4
	2	99,3	0,7
	3	99,4	0,6
	Promedio	<b>99,4</b>	<b>0,6</b>
<b>pH 6,8</b>	1	99,4	0,6
	2	98,9	1,1
	3	99,7	0,3
	Promedio	<b>99,3</b>	<b>0,7</b>

Tabla N°17: Resultados de robustez al 100%. Solución analizada a **35°C** en los tres pH de trabajo.

Medio	Nº Inyección	% Recuperación	% variación
<b>pH 1,2</b>	1	99,8	0,2
	2	100,3	0,3
	3	100,8	0,8
	Promedio	<b>100,3</b>	<b>0,3</b>
<b>pH 4,5</b>	1	100,2	0,2
	2	100,2	0,2
	3	100,1	0,1
	Promedio	<b>100,2</b>	<b>0,2</b>
<b>pH 6,8</b>	1	100	0,0
	2	99,7	0,3
	3	100	0,0
	Promedio	<b>99,9</b>	<b>0,1</b>

- Se observa que la diferencia entre los valores promedio en cada medio respecto al valor de referencia no excede un 5%. Respecto a los tiempos de retención, la variación promedio en los tres medios evaluados fue de ± 0,5 min (30 s).

Por lo tanto se puede afirmar que el método es robusto en las condiciones evaluadas (cambio de temperatura de 30°C ± 5°C y cambio de columna cromatográfica de 300 mm a 150 mm) en los tres medios de disolución evaluado.

## 8) Influencia del filtro:

Se realizan pruebas para establecer si el filtro descrito en la técnica de análisis (Millipore® HVLP Durapore® de 0,22 µm) que se utiliza en el tratamiento del estándar y muestras, retiene o no el activo. La comparación se realiza para una misma muestra en que una fracción será filtrada y la otra no. Las Tablas N°18 y N°19 se refieren a la influencia del filtro en el estándar y en la muestra respectivamente.

Tabla N°18: Resultados de la influencia del filtrado al 100% de la solución estándar en los tres pH de trabajo.

Medio	muestra	% recup.	% promedio	CV (%)
pH 1,2	1	99,7	99,9	0,3
	2	100,2		
pH 4,5	1	99,0	99,4	0,5
	2	99,7		
pH 6,8	1	98,8	99,9	1,5
	2	100,9		

Tabla N°19: Resultados de la influencia del filtrado al 100% de la solución muestra en los tres pH de trabajo.

Medio	muestra	% recup.	% promedio	CV (%)
pH 1,2	1	100,2	100,1	0,1
	2	100,0		
	3	100,0		
pH 4,5	1	100,1	100	1,0
	2	101,1		
	3	99,2		
pH 6,8	1	99,7	99,8	0,3
	2	99,6		
	3	100,1		

- El porcentaje de recuperación de paracetamol en los 3 medios evaluados está entre el 98 y 102%

Por lo tanto se observa que el filtro utilizado en la metodología para filtrar la solución estándar y las muestras no retiene al activo luego de su uso.

### 9) Precisión intermedia:

Este parámetro se realiza para determinar la variabilidad del método utilizado, efectuando una serie de análisis sobre 12 comprimidos en estudio en cada uno de los tres pH de trabajo, con su proceso de fabricación previamente validado, dentro del mismo laboratorio pero con dos equipos HPLC y dos analistas diferentes. De esta manera, se pretende establecer la influencia que tiene esta modificación en los resultados del análisis. Desde las Tablas N°20 hasta la Tabla N°26 se exhiben los resultados desglosados por pH, por equipo y analista.

Tabla N°20: Resultados de precisión intermedia a pH 1,2 por F. Gaete en HPLC Waters.

<b>pH 1,2</b>	<b>Equipo HPLC: Waters Alliance</b>	<b>Analista: Francisco Gaete</b>
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
<b>5 min</b>	<b>72%</b>	
<b>10 min</b>	<b>92%</b>	
<b>15 min</b>	<b>96%</b>	
<b>20 min</b>	<b>97%</b>	
<b>30 min</b>	<b>98%</b>	

Tabla N°21: Resultados de precisión intermedia a pH 1,2 por V. Morales en HPLC Merck.

<b>pH 1,2</b>	<b>Equipo HPLC: Merck LaChrome-Elite</b>	<b>Analista: Verónica González</b>
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
<b>5 min</b>	<b>75%</b>	
<b>10 min</b>	<b>93%</b>	
<b>15 min</b>	<b>95%</b>	
<b>20 min</b>	<b>93%</b>	
<b>30 min</b>	<b>93%</b>	

Tabla N°22: Resultados de precisión intermedia a pH 4,5 por F. Gaete en HPLC Waters.

<b>pH 4,5</b>	<b>Equipo HPLC: Waters Alliance</b>	<b>Analista: Francisco Gaete</b>
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
<b>5 min</b>	<b>84%</b>	
<b>10 min</b>	<b>95%</b>	
<b>15 min</b>	<b>97%</b>	
<b>20 min</b>	<b>98%</b>	
<b>30 min</b>	<b>99%</b>	

Tabla N°23: Resultados de precisión intermedia a pH 4,5 por V. Morales en HPLC Merck.

pH 4,5	Equipo HPLC: Merck LaChrome-Elite	Analista: Verónica González
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
5 min	91%	
10 min	97%	
15 min	97%	
20 min	96%	
30 min	94%	

Tabla N°24: Resultados de precisión intermedia a pH 6,8 por F. Gaete en HPLC Waters.

pH 6,8	Equipo HPLC: Waters Alliance	Analista: Francisco Gaete
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
5 min	86%	
10 min	95%	
15 min	95%	
20 min	94%	
30 min	94%	

Tabla N°25: Resultados de precisión intermedia a pH 6,8 por V. Morales en HPLC Merck.

pH 6,8	Equipo HPLC: Merck LaChrome-Elite	Analista: Verónica González
<b>Tiempo</b>	<b>Promedio 12 vasos</b>	
5 min	89%	
10 min	96%	
15 min	97%	
20 min	96%	
30 min	94%	

Tabla N°26: Tabla resumen. Diferencias de resultados de precisión intermedia.

Tiempos muestreo	diferencia pH 1,2	diferencia pH 4,5	diferencia pH 6,8
5 min	3%	7%	3%
10 min	1%	2%	1%
15 min	1%	0%	2%
20 min	4%	2%	2%
30 min	5%	5%	0%

- La diferencia entre ambos análisis no es mayor al 10% en tiempos donde se han disuelto  $\leq 85\%$  paracetamol.
- La diferencia entre ambos análisis no es mayor al 5% en tiempos donde se han disuelto  $\geq 85\%$  paracetamol.

Por lo tanto se puede concluir que el método es preciso al aplicarlo bajo las diferentes condiciones estudiadas intralaboratorio.

## 10) Perfiles Comparativos:

**Criterios de Aceptación:** para permitir el uso de los datos promedios de los 12 vasos medidos en cada solución amortiguadora, se deben cumplir las siguientes condiciones:

- $CV \leq 20\%$  en los primeros tiempos del perfil (5 y 10 minutos).
- $CV \leq 10\%$  en el resto de los tiempos del perfil (15, 20 y 30 minutos).
- Valor de  $f_2 \geq 50$  demuestra similitud entre los productos farmacéuticos comparados.
- Cuando el principio activo contenido tanto en el producto de referencia (comparador) como en el producto en estudio, se disuelve en un porcentaje de 85% o más de la cantidad declarada del fármaco a los 15 minutos o menos, utilizando los tres medios de disolución recomendados en la guía técnica [8], no es necesaria la comparación de perfiles con una prueba de  $f_2$ . En las Tablas N° 27, 28 y 29 se muestran los resultados resumidos del promedio de disolución.

Gráfico N°4: comparación de curvas de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg en pH tampón pH 1,2

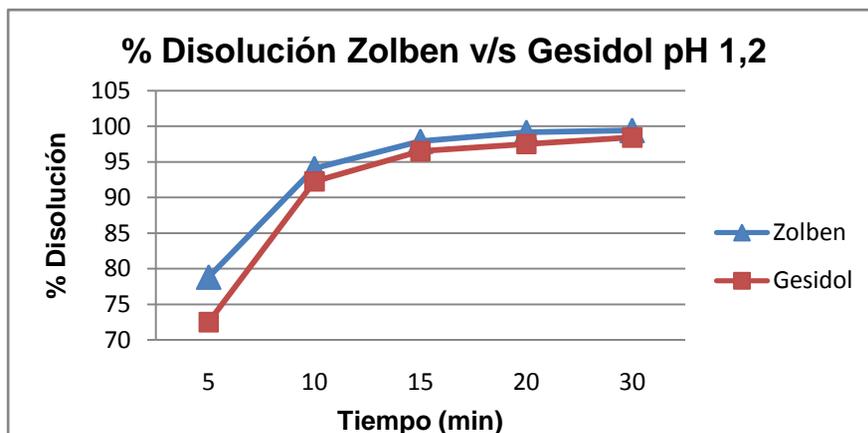


Gráfico N°5: comparación de curvas de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg en tampón pH 4,5

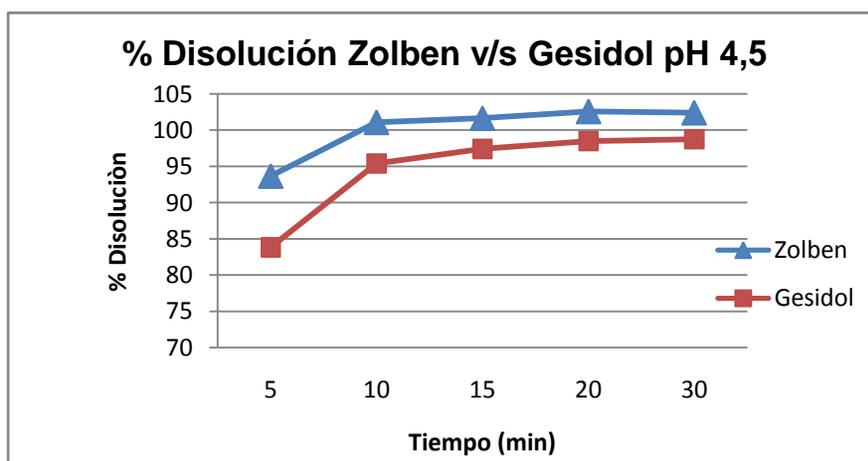


Gráfico N°6: comparación de curvas de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg en tampón pH 6,8.

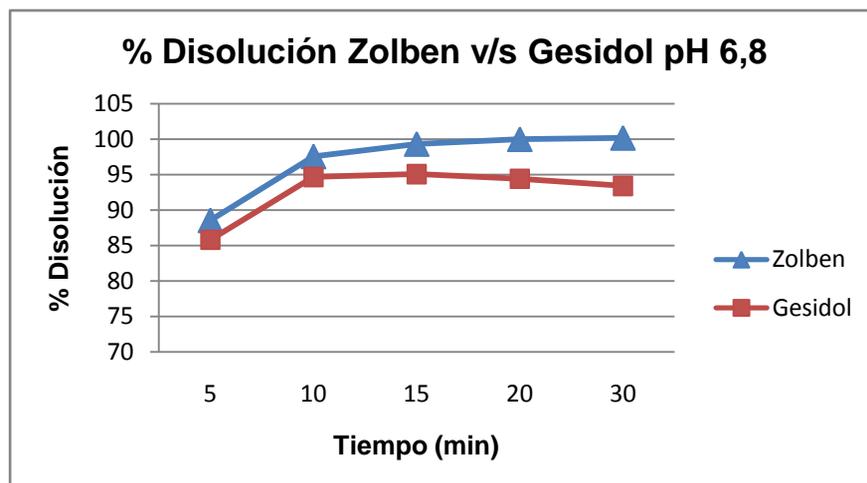


Tabla N°27: Resultados resumen de perfiles de liberación-disolución de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg a pH 1,2.

t (min)	% prom. disuelto ZOLBEN®	DS	CV (%)	% prom. disuelto GESIDOL®	DS	CV (%)
5	78,8	1,3	1,7	72,5	11,1	15,3
10	94,1	1,2	1,3	92,3	3,8	4,1
15	97,9	0,8	0,8	96,5	2,1	2,1
20	99,2	0,6	0,6	97,5	2,4	1,5
30	99,4	0,7	0,7	98,4	1,4	1,4

Tabla N°28: Resultados resumen de perfiles de liberación-disolución de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg a pH 4,5.

t (min)	% prom. disuelto ZOLBEN®	DS	CV (%)	% prom. disuelto GESIDOL®	DS	CV (%)
5	93,67	0,78	0,83	83,83	3,69	4,40
10	101,08	0,51	0,51	95,42	1,08	1,14
15	101,67	0,89	0,87	97,42	0,90	0,92
20	102,58	1,00	0,97	98,50	0,67	0,68
30	102,42	1,16	1,14	98,75	0,97	0,98

Tabla N°29: Resultados resumen de perfiles de liberación-disolución de Zolben® 500 mg y Gesidol® 500 mg a pH 6,8.

t (min)	% prom. disuelto ZOLBEN®	DS	CV (%)	% prom. disuelto GESIDOL®	DS	CV (%)
5	88,58	1,00	1,12	85,83	3,43	4,00
10	97,58	0,67	0,69	94,67	1,37	1,45
15	99,33	0,78	0,78	95,08	1,56	1,65
20	100,00	0,95	0,95	94,42	0,67	0,71
30	100,17	1,11	1,11	93,42	0,90	0,96

- Se observa que el CV es menor al 20% en los primeros dos tiempos del perfil (5 y 10 minutos).
- Se observa que el CV es menor al 10% en el resto de los tiempos del perfil (15, 20 y 30 minutos).
- Se observa en este caso que todos los comprimidos ensayados se disolvieron en una cantidad mayor al 85% en menos de 15 minutos en los tres medios ensayados, por lo que aplica la comparación de los perfiles de disolución con la prueba de  $f_2$ .

**Por lo tanto:**

- Este análisis exhibe resultados satisfactorios respecto de la comparación de las curvas de disolución del producto innovador y del similar, observando que ambos productos se disuelven en una cantidad igual o mayor al 85% de la cantidad declarada de paracetamol en menos de 15 minutos en los tres medios de disolución especificados, por lo que en este caso no es necesaria la comparación de los perfiles de disolución a través de la prueba de  $f_2$ .
- Dado lo anterior, se puede clasificar al producto innovador y al similar como formas farmacéuticas sólidas de liberación muy rápida y preliminarmente se podría afirmar que corresponden a formulaciones equivalentes terapéuticas entre sí.

## CONCLUSIONES

- Se pudo conocer y realizar los análisis de rutina llevado a cabo en el laboratorio de control de calidad de Medipharm<sup>®</sup>, tales como los estudios de estabilidad de medicamentos, análisis de materias primas y excipientes usados en la fabricación de las variadas formulaciones farmacéuticas que posee el laboratorio.
- Se realizó una recopilación de información bibliográfica especializada sobre las características químicas y farmacológicas de paracetamol con el fin de demostrar la factibilidad de que este principio activo pudiese ser eximido de la realización de estudios de bioequivalencia *in vivo*.
- Se llevó a cabo la validación de la metodología analítica para el producto Gesidol<sup>®</sup> 500 mg como parte del estudio de bioequivalencia *in vitro* con los parámetros exigidos y sugeridos por el ISP. Todos los parámetros mostraron resultados satisfactorios y resultaron ser útiles para su utilización en el protocolo de análisis que forma parte del estudio de bioexención para Gesidol<sup>®</sup> comprimidos 500 mg.
- Se obtuvieron los perfiles de disolución de Gesidol<sup>®</sup> 500 mg y del medicamento innovador; se compararon dichos perfiles entre sí se verificó su similitud de comportamiento frente al ensayo de disolución. No se calculó el factor de similitud  $f_2$  debido a que no aplica realizarlo en formulación de liberación muy rápida.
- Finalmente en este estudio se realizó la validación de la metodología analítica para optar a la bioexención de Gesidol<sup>®</sup> comprimidos 500 mg y según los resultados obtenidos anteriormente, se puede establecer preliminarmente la equivalencia terapéutica de ambas formulaciones debido a que la validación de la metodología analítica es solo una parte acotada del total de estudios necesarios para poder demostrar equivalencia terapéutica. Por diversas razones no se adjuntaron los antecedentes que respaldaran la solubilidad del principio activo y la documentación de GMP de los proveedores y fabricantes, referidos tanto a las materias primas como a los procesos de fabricación del producto Gesidol<sup>®</sup> comprimidos 500 mg.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Página Web: Instituto de Salud Pública de Chile, Definición de Bioequivalencia, <[http://www.ispch.cl/medicamentos\\_bioequivalentes](http://www.ispch.cl/medicamentos_bioequivalentes)> Fecha de Consulta: 15/dic/13
- [2] Ministerio de Salud - Gobierno de Chile (2004). “*Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de Salud*”. Resolución Exenta N°515 de 2004.
- [3] Saavedra I., Iturriaga V., Ávila L., Quiñones L. (2011). “*Estudios de Bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos*”. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago.
- [4] Aceituno, A. (2012). “La Bioequivalencia: Estándar de eficacia para productos genéricos”. Agencia Nacional de Medicamentos, Instituto de Salud Pública de Chile.
- [5] Ministerio de Salud – Gobierno de Chile. (2005) “*Norma que define los criterios destinados a establecer Equivalencia Terapéutica en productos farmacéuticos en Chile*”. Resolución Exenta N°727 de 2005.
- [6] OPS/OMS. Informe Técnico N°937 (2006). “*Comité de expertos de la OMS en Especificaciones de Preparaciones Farmacéuticas*”. Cuadragésima edición.
- [7] Kataria MK, Bhandari A. (2012) “*Biopharmaceutics Drugs Disposition Classification System: An extension of Biopharmaceutics Classification System*”, International Research Journal of Pharmacy 2012; 3(3): 5-10.
- [8] Instituto de Salud Pública de Chile. (2007). *Guía Técnica G-BIOF02: “Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de formas farmacéuticas sólidas orales”*.
- [9] Instituto de Salud Pública de Chile (2010). “*Listado de Centros en Chile autorizados por el ISP para la realización de estudios in vitro para optar a Bioexención*”. Resolución N°1057, 21 de abril de 2010.
- [10] PÁGINA WEB: Drugbank: Acetaminophen (Paracetamol). <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00316>> Fecha de Consulta: 26/enero/2014
- [11] Budavari, S.; Heckelmann P., O’Neill M., Oberchain J., Smith A., (1996) “*The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*”. 12<sup>th</sup> edition.
- [12] L. Kalantzi, C. Reppas, J.B. Dressman, G.L. Amidon, H.E. Junginger, K.K. Midha, V.P. Shah, A. Stavchansky, Dirk M. Barends. (2005). “*Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Acetaminophen (Paracetamol)*”. (2005). Wiley InterScience<[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)>.

- [13] Benet L.Z. (2013) *“The Role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development”*. Journal of Pharm. Sciences: 2013 102 (1) 34-42.
- [14] Benet L.Z. (2009) *“Predicting Drug Absorption via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System”*. Pharmaceutical Research 2005; 22(1)12-23.
- [15] Dahan A, Miller J., Amidon G. (2009). *“Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World’s Top Oral Drugs”*. The AAPS Journal, Vol. 11 (4): 740-746.
- [16] Instituto de Salud Pública de Chile (2013). *“Aprueba protocolo de estudio para demostrar equivalencia terapéutica del producto Gesidol<sup>®</sup>, registro F-19078 de Medipharm<sup>®</sup>”*. Resolución exenta N°3572, 22 de octubre de 2013.
- [17] USP 36 - The United States Pharmacopeia. Rockville MD. The United States Pharmacopeial Convention, Inc.
- [18] Chaloner-Larsson (1998) *“Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF) Segunda Parte: Validación”*, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- [19] Decreto Supremo N°3: *“Aprueba reglamento del sistema nacional de control de los productos farmacéuticos de uso humano”*. Ministerio de Salud, Subsecretaría de salud pública, 25 de enero de 2010.